

# 小干扰 RNA 沉默 Toll样受体 4 表达对慢性温和应激 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠腹腔巨噬细胞 TLR 4/ NF- $\kappa$ B 途径基因表达的影响

顾洪丰<sup>1,2</sup>, 唐朝克<sup>1</sup>, 唐雅玲<sup>1</sup>, 覃 丽<sup>3</sup>, 杨永宗<sup>1</sup>

(南华大学 1. 心血管病研究所, 2. 生理学教研室, 3. 药理学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 小干扰 RNA; Toll样受体 4 慢性温和应激; 核因子  $\kappa$ B 肿瘤坏死因子  $\alpha$

[摘要] 目的 探讨小干扰 RNA (sRNA) 沉默 Toll样受体 4 (TLR4) 基因对慢性温和应激 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠腹腔巨噬细胞促炎症细胞因子表达的影响。方法 针对小鼠 TLR4 基因设计 2 条 sRNA 和一条无关序列, 再据每一序列合成两条互补并含 sRNA 正反义链的 DNA, 退火后与含 GFP 的载体 pRNAT-H1.1/Adeno 相连, 转染 293A 细胞, 实时荧光 PCR 筛选有效的一条 sRNA, 经腺病毒颗粒包装与病毒扩增并感染 293A 细胞, G418 筛选后, 挑取单个阳性克隆放大培养, 检测病毒滴度。120 只雄性 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠随机分为三组: (1) 慢性温和应激组; (2) 慢性温和应激 + sRNA 组 (10  $\mu$ L/只, 尾静脉注射, 每 5 日一次); (3) 慢性温和应激 + 腺病毒空载体组。每组 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 40 只, 实验动物都以高脂、高胆固醇饲料喂养, 分别在接受慢性温和应激 0、4、12 周后 3 个时间点处死动物, 收集小鼠腹腔单核巨噬细胞, 以 Western Blotting 方法检测其 TLR4 和核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 蛋白表达, ELISA 法检测腹腔单核巨噬细胞培养上清液白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达。结果 转染 sRNA1 和 sRNA2 后的 292A 细胞中 TLR4 mRNA 表达水平较空白对照组分别下降 56% 和 67%, 逐孔稀释滴度测定法测定的病毒滴度为  $3.4 \times 10^{14}$  TU/L; 遭受 4、12 周慢性温和应激后, ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血浆中皮质醇激素显著升高, 但在同一时间点内, 各组 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血浆皮质酮激素浓度相比, 差异没有统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与同一时期慢性温和应激组相比, sRNA 组腹腔巨噬细胞 TLR4 和核因子  $\kappa$ B 蛋白表达水平明显降低 (均  $P < 0.05$ ), 其培养细胞上清液中的白细胞介素 1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  含量显著减少 ( $P < 0.01$ )。结论 sRNA 沉默 TLR4 基因能有效抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B-IL-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  的表达, 提示 TLR4/NF- $\kappa$ B 途径在慢性温和应激诱导的慢性炎症应答中可能有着重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Silencing Toll-Like Receptor 4 Expression on the Expression of Toll-Like Receptor 4 / Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling Pathway in Peritoneal Macrophages of Chronic Mild Stress ApoE<sup>-/-</sup> Mice

GU Hong-Feng<sup>1,2</sup>, TANG Chao-Ke<sup>1</sup>, TANG Ya-Ling<sup>1</sup>, QIN Li<sup>3</sup>, and YANG Yong-Zong<sup>1</sup>

(1. Institute of Cardiovascular Disease, 2. Department of Physiology, 3. Department of Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Small Interfering RNA; Toll-Like Receptor 4; Chronic Mild Stress; Nuclear Factor- $\kappa$ B; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

[ABSTRACT] **Aim** To examine the effect of Toll-like receptor 4 (TLR4) gene silencing by small interfering RNA (sRNA) on the expression of cytokines produced by peritoneal macrophages in chronic mild stress (CMS) ApoE<sup>-/-</sup> mice.

**Methods** Two sRNA sequences and one negative control sequence were designed targeting the mouse TLR4 gene. Two complementary single-strand DNA were designed and synthesized based on sRNA sequences. The DNA fragments were annealed and ligated to the GFP expression vector pRNAT-H1.1/Adeno. One sRNA with higher interference efficiency than the other was found after sRNA plasmid transfection into 293A cells mediated by liposome. After adenovirus particulate

[收稿日期] 2010-10-01

[基金项目] 国家自然科学基金 (81000946) 和湖南省教育厅基金 (09C835)

[作者简介] 顾洪丰, 博士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化性疾病发病机制及其防治, Email 为 gh513@sina.com。唐朝克, 博士后, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化性疾病发病机制, Email 为 tchaok@ yahoo.com.cn。通讯作者杨永宗, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化性疾病发病机制及其防治, Email 为 yzyanghy@ 163.com。

packaging and production, the 293A cells were infected and the single cell clone was acquired and cultured to establish the stable cell strain. The titer of concentrated virus was detected by hole-by-dilution titer assay. One hundred twenty male ApoE<sup>-/-</sup> mice were divided into groups of CMS control, CMS + empty vector and CMS + sRNA (tail vein injection, 10  $\mu$ L/mouse,  $n = 40$  per group). All mice were fed a high-fat (5%, wt/w), high-cholesterol (1%, wt/wt) diet and subjected to daily CMS for 4, 12 weeks respectively. Peritoneal macrophages were prepared from ApoE<sup>-/-</sup> mice and then total proteins from cells were extracted. Western Blotting was used to determine the expressions of TLR4 and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) of peritoneal macrophages. The supernatants of cultured peritoneal macrophages were collected and then used for detection of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels by ELISA. **Results**

Compared with the blank control group, real-time PCR showed that the expression of TLR4 mRNA in 293A cells was decreased by 56% and 67% after 48 h transfection with sRNA1 and sRNA2 respectively. The hole-by-dilution titer assay showed that viral titer was  $3.4 \times 10^{14}$  TU/L. After exposure to CMS for 4 and 12 weeks, there was no difference in serum corticosterone levels between sRNA group and the CMS control group ( $P > 0.05$ ), and sRNA group mice demonstrated markedly decrease in TLR4 ( $P < 0.05$ ) and NF- $\kappa$ B ( $P < 0.05$ ) levels of peritoneal macrophages compared with the corresponding control group respectively. IL-1 $\beta$  ( $P < 0.01$ ) and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) levels in supernatants of cultured peritoneal macrophages of sRNA group were significantly lower than those of the CMS group. **Conclusion** These results showed that sRNA effectively inhibited the expressions of TLR4/NF- $\kappa$ B-IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of peritoneal macrophages in CMS ApoE<sup>-/-</sup> mice, which suggested that the activation of TLR4 pathway of macrophages might play an important role in chronic inflammation response induced by CMS.

近年来,心理社会因素等应激因素在心血管疾病中的作用日益受到关注,人们试图阐明应激致使心血管病发生、发展的确切机制<sup>[1,2]</sup>。有研究提示,心理社会因素致使的慢性免疫炎症性应答参与了动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等心血管疾病的病理过程,但对慢性应激诱导免疫炎症应答的确切机制尚未明确。遭受慢性温和应激(chronic mild stress, CMS)的动物和人体血浆中多种炎症因子如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )等显著升高<sup>[3]</sup>。我们<sup>[4,5]</sup>先前的研究表明 CMS显著上调 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉 Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)的表达;明显升高其血清 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 浓度,形成高细胞因子血症。目前对 CMS状态下机体致炎症细胞因子水平增加的机制亟待阐明。作为天然免疫细胞,单核巨噬细胞与其它免疫细胞一样通过表达 TLR4等模式识别受体<sup>[6]</sup>;此外,其细胞表面表达糖皮质激素受体与 $\beta$ 肾上腺能受体<sup>[7]</sup>,因此,在机体遭受应激状况下,单核巨噬细胞在机体的免疫与炎症应答改变中起着重要作用。本实验通过构建 TLR4小分子干扰腺病毒载体转染4周龄 CMS ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,沉默 TLR4的表达,以探讨在 CMS状态下单核巨噬细胞是否通过 TLR4/NF- $\kappa$ B信号途径生成、释放 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 等细胞因子参与 CMS所致的免疫性炎症反应,进而促成 As等炎症性疾病发生与发展的慢性免疫性炎症应答。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E knock-out ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠 120只,雄性,4周龄,体重 17~18 g 购自北京大学实验动物部(引自 American Jackson Laboratory)。大肠杆菌 DH-5、293A 细胞、pRNAT-H1.1/Adeno sRNA 表达载体均购自上海闪晶生物公司。兔抗小鼠 TLR4 多克隆抗体(ab47093)与 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(abcam 公司);兔抗小鼠核因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (p65)抗体(Cell Signaling Technology, 3037);辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(北京中杉金桥);琼脂糖(Sigma 公司);EDTA(BCO 公司),RPMI1640培养基与胎牛血清(四季青公司);Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000和 RNA 抽提试剂盒(Trizol试剂)(Invitrogen 公司);MluI、HindⅢ和腺病毒包装系统(上海闪晶生物公司)。

### 1.2 sRNA 表达载体构建

OligoEngine RNA i 软件设计 2 条针对小鼠 TLR4 基因的 RNA 干扰靶序列,对于每条选定的小干扰 RNA (sRNA)靶序列,合成 2 条互补的含 sRNA 正义链和反义链的 DNA 模板,以 10 个脱氧核苷酸的 Loop 结构相连,后面接 RNA Poly(A)聚合酶转录终止位点,两端分别引入 MluI 和 HindⅢ酶切位点。2 条单链 DNA 经退火后与含 GFP 的质粒 pRNAT-H1.1/Adeno 连接;连接产物转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌,在 LB kana 培养基上涂板,37℃培养过夜。每组样

品挑取 2 个单菌落经 PCR 检测, 培养阳性菌落, 提取质粒测序鉴定。模板链序列如下: TLR4-1 为 5'-ACGCGTGACTCAGCAAAGTCCCTGATTTGATATC-CGATCAGGGACTTTGCTGAGTTTTTTCCAAAAGCTT-3'; TLR4-2 为 5'-ACGCGTGATTACCTACCAATG-CATGTTGATATCCGCATGCATTGGTAGGTAATATTTT-TTCCAAAAGCTT-3' (下划线示靶序列正义链, 斜体示靶序列反义链, 中间为 loop 结构)。

### 1.3 有效 sRNA 序列的筛选

接种 293A 细胞至 6 孔板中, 培养 24 h, 贴壁细胞达 85%, 换新鲜 DMEM + 10% FBS 的培养基。取 6 支 Eppendorf 管, 其中 3 管按照每孔加入 250  $\mu$ L OptiMEM, 再加入 5  $\mu$ g 的质粒 DNA, 另外 3 管则每孔加入 250  $\mu$ L OptiMEM, 再加入 10  $\mu$ L Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 静置 5 min 后将两种液体混合, 静置 25 min 滴加至细胞液中, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养 48 h 后, 提取总 RNA, 经 MMLV 逆转录酶合成 cDNA 后, 以  $\beta$ -actin 为内参照, Real-time PCR 检测干扰效率。 $\beta$ -actin 与 TLR4 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 40 s 进行 40 个循环。配好反应体系后, 将各个样品逐一加入 96 孔板中, 每个样品设置 3 个复孔。Real-time PCR 反应在 ABI7500 (美国 AB 公司) 的实时定量 PCR 系统上进行, 重复 3 次。

### 1.4 病毒的包装、生产和滴度测定

腺病毒包装质粒混合物和 sRNA2 腺病毒穿梭质粒共转染 293A 细胞, 24 h 换为含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 48 h 收集细胞, 4 000 g 离心 10 min, 0.45  $\mu$ m 的 PVDF 膜过滤上清液, 用作待测病毒液。使用逐孔稀释滴度法测定病毒滴度, 具体操作为接种 293A 细胞至 96 孔板中, 每孔中加入  $4 \times 10^4$  细胞。根据病毒的预期滴度, 准备 7~10 个无菌的 Eppendorf 管, 在每个管中加入 90  $\mu$ L 新鲜培养基。取待测定的病毒原液 10  $\mu$ L 加入到第一个管中, 混匀后, 取 10  $\mu$ L 加入到第二个管中; 继续相同的操作直到最后一管。选取所需的细胞孔, 吸去 90  $\mu$ L 培养基, 加入稀释好的病毒溶液, 放入培养箱培养, 4 天后, 观察细胞生长状况, 并收取细胞进行后续滴度测定。计算出荧光细胞比例在 10% 左右的荧光细胞个数和病毒稀释比例, 将得到的数值除以相应的稀释倍数就得到了病毒原液的滴度值。

### 1.5 实验动物分组

120 只 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠置于清洁、无病原体的动物实验室, 温度为 23  $\pm$  1  $^{\circ}$ C, 相对湿度为 55% ~

60%; 每笼 5 只 (聚碳酸酯鼠笼的容积大小为 8 cm  $\times$  13.5 cm  $\times$  8.1 cm), 垫料为消毒、干燥后的木屑, 每 5 天换一次垫料, 饮用水为消毒的蒸馏水。所有小鼠在相同的环境下平衡 1 周后开始实验。随机将 120 只 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠分成三组: (1) CMS 组; (2) CMS + sRNA 组 (10  $\mu$ L/只, 尾静脉注射, 每 5 日一次); (3) CMS + 腺病毒空载体组。每组 40 只, 实验动物都以高脂、高胆固醇饲料 (5% 猪油, 1% 的胆固醇) 喂养。分别在试验开始后的第 0、4 和 12 周 3 个时间点处死动物。

### 1.6 慢性温和应激动物模型的建立

本实验采用的应激方案在 Yalcin 等<sup>[8]</sup>建立的慢性应激模型基础上进行了改进, 具体为垫料用水打湿 17 h (每周 1 次); 昼夜颠倒 7 或 17 h (每周 2 次); 鼠笼倾斜成 45 $^{\circ}$  角 7 或 17 h (每周 2 次); 噪声刺激 9 或 15 h (每周 2 次, 80 dB); 恐惧刺激 1 h (放入大鼠刚住过鼠笼, 每周 2 次)。应激试验组小鼠按顺序接受每个应激原的刺激。

### 1.7 血浆皮质醇激素浓度测定

ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠, 于每周周一的上午 9:00~10:00 空腹从眼眶静脉窦采血 0.1 mL, 0.5% EDTA-Na<sub>2</sub> 抗凝, 冰浴冷却, 1100 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 采用 <sup>125</sup>I-皮质醇放射性免疫检测试剂盒测定血浆皮质醇的含量, 此过程贯穿于整个实验。ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠采血后, 立刻经腹腔注射 0.5 mL 无菌生理盐水。<sup>125</sup>I-皮质醇放射性免疫检测试剂盒的检测灵敏度为 16  $\mu$ g/L, 批内与批间变异系数分别为 12.2% 和 14.9%。

### 1.8 腹腔巨噬细胞制备、培养及其培养上清液的收集

常规方法收集小鼠腹腔巨噬细胞, 把采集到的巨噬细胞以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释成  $1 \times 10^9$  个/L 的细胞悬液, 置于 24 孔板培养。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 24 h 后, 收集培养上清液, -20 $^{\circ}$ C 保存, 待测巨噬细胞上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的浓度。

### 1.9 酶联免疫吸附法检测慢性温和应激 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠腹腔单核巨噬细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 浓度

取已制备好的培养细胞上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 即刻测量标本 OD<sub>450</sub> 值。通过标准品吸光度值绘出标准曲线, 并根据标准曲线查找其对应的浓度范围; 每组样品点 3 孔。

### 1.10 Western Blotting 检测慢性温和应激 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠巨噬细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的表达

收集细胞, 经 PBS 洗涤 3 次, 加入含蛋白酶抑

制剂的细胞裂解液中裂解细胞后,于 4℃、12 000 × g 离心 7 min,小心吸出上清液,用 BCA 法进行蛋白质定量。取 50 μg 蛋白质/泳道加入等体积 5 × SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸使蛋白变性。60 V 积层胶,120 V 分离胶,电泳分离细胞蛋白质,60~100 mA 1 h 将蛋白质用半干转膜仪转移至 PDVF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,加入一抗,4℃ 孵育 6~12 h, TBST 洗膜 5~10 min × 3 次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,4℃ 孵育 4~8 h, TBST 洗膜 5~10 min × 3 次;然后用 Western Blotting 荧光检测试剂激发荧光,显示于 X 光片,显影,定影后进行图像分析。

### 1.11 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组均数间差异性检验采用小样本 *t* 检验;多组之间比较采用 OneWay ANOVA 方差分析,由 SPSS12.0 统计软件完成。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 sRNA 阳性重组子的筛选与鉴定

阳性质粒 DNA 经 PCR 扩增后可得到包括插入 sRNA 片段的产物 (334 bp) (图 1, Figure 1);测序

结果与设计的序列一致 (图 2, Figure 2)。

### 2.2 有效 sRNA 干扰序列筛选

提取 3 个不含内毒素的表达质粒 DNA (图 3, Figure 3) 分别转染 293A 细胞,24 h 转染效率约为 50%,48 h 提取总 RNA,以  $\beta$ -actin 为内参,Real-time PCR 检测 TLR4 表达,2 号质粒转染的内源性 TLR4 表达是未转染细胞的 33%,即 67% 的 TLR4 被 sRNA 抑制,因此选用 2 号质粒进行后续实验。

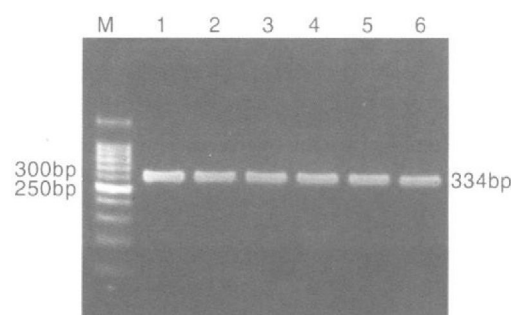


图 1. PCR 扩增筛选阳性重组子 M 为 DNA Ladder 1 和 2 为 sRNA1 PCR 产物,3 和 4 为 sRNA2 PCR 产物,5 和 6 为 sRNA 阴性 PCR 产物。

Figure 1. DNA fragments with sRNA sequences were obtained by PCR

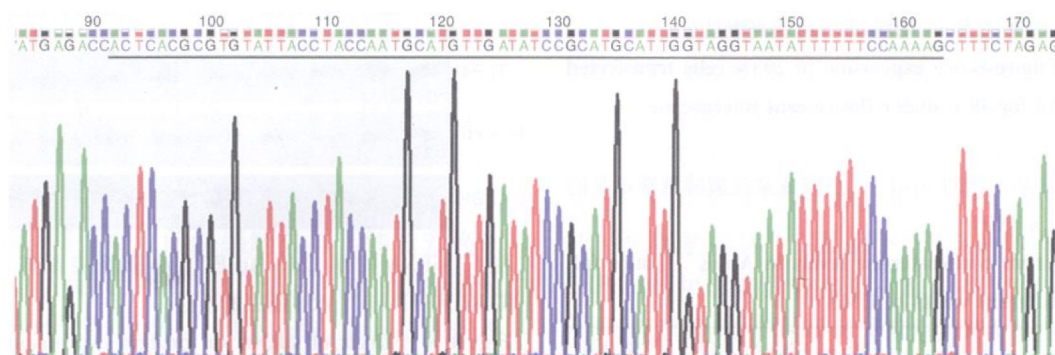


图 2. sRNA2 质粒 DNA 测序图谱

Figure 2. sRNA2 positive recombinants were sequenced with plasmid vector primer

### 2.3 病毒颗粒感染 293A 细胞和稳转细胞株的筛选

腺病毒包装质粒混合物和 sRNA2 腺病毒穿梭质粒共转染 293A 细胞,逐孔稀释滴度测定法检测病毒滴度为  $3.4 \times 10^{14}$  TU/L。病毒液感染的 293A 细胞 48 h 出现荧光,贴壁率约为 85%,96 h 感染率接近 100%。经反复冻融和传代,荧光表达稳定 (图 4, Figure 4)。

### 2.4 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血浆皮质醇激素浓度变化

CMS 组、CMS+ sRNA 组和 CMS+ 空载体组小鼠

血浆中皮质醇基线 (0 周) 水平均小于 100 μg/L, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而经受 4 周 CMS 后, 各组小鼠血浆中皮质醇激素水平显著高于基线水平 ( $P < 0.01$ ); 而应激 12 周后, CMS 组、CMS+ sRNA 组和 CMS+ 空载体组小鼠血浆皮质醇激素水平是 0 周时的 10 倍左右 ( $P < 0.001$ ), 但在同一时间点内, 各组小鼠血浆皮质醇激素浓度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 表明 CMS 应激模型已成功建立 (表 1, Tabel 1)。



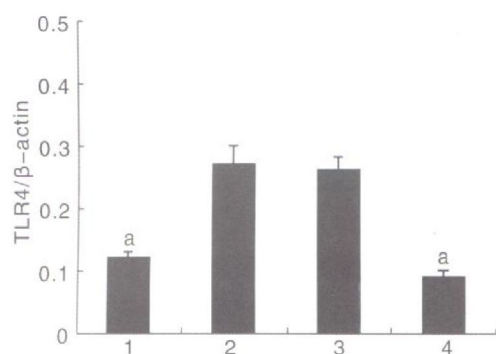


图3. Real-time PCR 检测 siRNA 对 Toll 样受体 4 mRNA 表达的影响 1 为 siRNA1 转染组,2 为非转染组,3 为阴性对照转染组,4 为 siRNA2 转染组;a 为  $P < 0.05$ ,与非转染组相比。

Figure 3. Results of siRNA interference of TLR4 expression using real-time PCR

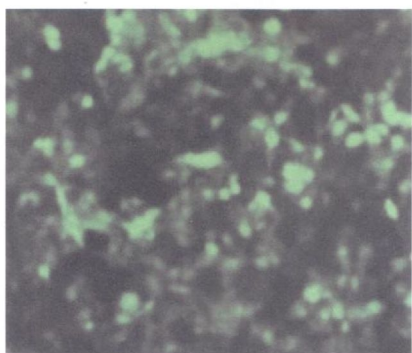


图4. siRNA2 转染 293A 细胞 48 h 后荧光表达 ( $\times 10$ )

Figure 4. Fluorescence expression of 293A cells transfected with siRNA2 for 48 h under fluorescent microscope

表 1. 慢性温和应激对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血浆皮质醇激素水平的影响 ( $\mu\text{g/L}$ ,  $n = 10$ )

Table 1. Serum corticosterone levels in ApoE<sup>-/-</sup> mice following at different weeks of CMS

应激时间	CMS组	CMS+ siRNA组	CMS+ 空载体组
0周	36.8 ± 5.6	35.6 ± 5.1	38.1 ± 6.2
4周	232.6 ± 28.3 <sup>a</sup>	240.1 ± 26.7 <sup>a</sup>	229.8 ± 23.1 <sup>a</sup>
12周	386.4 ± 31.8 <sup>b</sup>	391.3 ± 40.3 <sup>b</sup>	378.6 ± 34.7 <sup>b</sup>

a为  $P < 0.01$ , b为  $P < 0.001$ ,与本组 0周时相比。

## 2.5 sRNA 对 CMS ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠巨噬细胞培养上清液 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 表达的影响

0周时,各组小鼠腹腔巨噬细胞培养上清液 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达较低 (均  $P > 0.05$ )。给予 4 周 CMS 刺激后, CMS 组和空载体组小鼠腹腔巨噬细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达比 0 周时显著增加,而 sRNA 组则变化不明显,与 CMS 组 4 周时相比 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达显著减少 ( $P < 0.01$ )。予 12

周 CMS 刺激后, CMS 组和空载体组小鼠腹腔巨噬细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达继续增加,而 sRNA 组小鼠腹腔巨噬细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达仍变化不显著,与 12 周时 CMS 组相比显著减少 ( $P < 0.01$ )。各时期空载体组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达与 CMS 组相比,差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ , 表 2, Table 2)。

## 2.6 Western Blotting 检测 sRNA 对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠腹腔巨噬细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响

0 周时,各组小鼠腹腔巨噬细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达较低。给予 4 周 CMS 刺激后, CMS 组和空载体组小鼠腹腔巨噬细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达比 0 周时均显著增加,而 sRNA 组则变化不明显,与 4 周时相比 CMS 组 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.01$ )。予 12 周 CMS 刺激后, CMS 组和空载体组小鼠腹腔巨噬细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达继续增加,而 sRNA 组小鼠腹腔巨噬细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达仍变化不显著,与 12 周时 CMS 组相比 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.01$ )。各时期空载体组 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达与 CMS 组相比,差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ , 图 5 和表 3, Figure 5 and Table 3)。

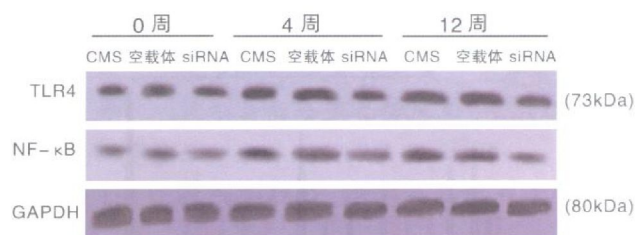


图 5. sRNA 抑制 CMS ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠腹腔单核巨噬细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B (p65) 蛋白的表达

Figure 5. Effects of sRNA on protein expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B (p65) in the supernatants of cultured peritoneal macrophages in CMS ApoE<sup>-/-</sup> mice

## 3 讨论

大量的研究表明,慢性应激与动脉粥样硬化等心血管疾病慢性炎症反应有关,且慢性应激所增加的细胞因子随应激源类型而异<sup>[6-9]</sup>。但目前对 CMS 应激时机体高细胞因子来源及其产生机制并不清楚,因此,需要进一步的实验来阐明如何将 CMS 转化为机体免疫细胞激活的确切信号途径。在本研究中我们通过 sRNA 沉默 TLR4 的表达来进一步阐明其在 CMS 所诱导动脉粥样硬化慢性炎症应答中的作用及其机制。

表 2. sRNA 对 CMS ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠腹腔单核巨噬细胞 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达的影响 ( $\mu\text{g/L}$ ,  $n=10$ )Table 2. Effects of sRNA on IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in the supernatants of cultured peritoneal macrophages in CMS ApoE<sup>-/-</sup> mice

分 组	IL-1 $\beta$			TNF- $\alpha$		
	0周	4周	12周	0周	4周	12周
CMS组	4.03 $\pm$ 0.42	27.53 $\pm$ 3.27 <sup>a</sup>	30.26 $\pm$ 2.83 <sup>a</sup>	3.61 $\pm$ 0.40	15.82 $\pm$ 1.87 <sup>a</sup>	17.53 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>
CM + sRNA 组	3.92 $\pm$ 0.44	5.17 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	4.81 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	3.42 $\pm$ 0.36	3.06 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	3.72 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>
CM + 空载体组	4.37 $\pm$ 0.51	28.08 $\pm$ 3.52 <sup>a</sup>	29.33 $\pm$ 3.72 <sup>a</sup>	3.36 $\pm$ 0.42	16.94 $\pm$ 2.16 <sup>a</sup>	19.25 $\pm$ 2.73 <sup>a</sup>

a为  $P < 0.05$  与本组 0周时相比; b为  $P < 0.05$  与同时期 CMS组相比。

表 3. sRNA 抑制 CMS ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠腹腔单核巨噬细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B (p65) 蛋白的表达 ( $n=3$ )Table 3. Effects of sRNA on protein expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B (p65) in the supernatants of cultured peritoneal macrophages in CMS ApoE<sup>-/-</sup> mice

分 组	TLR4			NF- $\kappa$ B		
	0周	4周	12周	0周	4周	12周
CMS组	0.28 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
CM + sRNA 组	0.29 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.21 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
CM + 空载体组	0.31 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>

a为  $P < 0.05$  与本组 0周时相比; b为  $P < 0.05$  与同时期 CMS组相比。

本研究结果表明, sRNA 沉默 TLR4 的表达能显著抑制 CMS ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠腹腔巨噬细胞的免疫性炎症应答。与 CMS 组相比, sRNA 组腹腔巨噬细胞 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达明显减少 ( $P < 0.05$ ), 且其腹腔巨噬细胞上清液中的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平也显著降低 ( $P < 0.05$ )。这提示 TLR4 途径可能在 CMS 所致的高细胞因子血症中起重要作用。本研究结果与 Grippo 等<sup>[10]</sup> 的相一致, 该作者认为, CMS 抑郁症模型小鼠的快感缺失与其体内升高的血浆 IL-1 $\beta$  等促炎症细胞因子水平有关; 而本研究结果与 Kunz-Ebrecht 等<sup>[11]</sup> 的不一致, 上述结果的不一致性可能归因于应激源类型、强度和应激时间长短等的差异。

本研究结果表明, TLR4 sRNA 干预并不显著降低 CMS ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血浆中的皮质醇激素浓度, 这提示 CMS 状态下, sRNA 降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平不是通过干预皮质醇的生成与释放来实现的, 而是通过调节应激激素以外的途径。本研究中 CMS 诱导的应激激素升高而促进机体的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达增加, 可能归因于神经内分泌改变与机体免疫应答激活有关。有研究表明糖皮质激素明显增加 TLR4 的表达<sup>[12-13]</sup>。因此, 可以推测, 在 CMS 应激状况下, 糖皮质激素等主要应激激素通过上调 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的表达, 致使单核巨噬细胞分泌的 TNF- $\alpha$  和

IL-1 $\beta$  等致炎细胞因子增加, 进而促进免疫性炎症应答。

本研究结果发现, sRNA 沉默 TLR4 后, 其下游信号转导途径中的 NF- $\kappa$ B (p65) 表达显著下降, 且该途径激活后的 IL-1 $\beta$  等促炎症因子生成与释放明显减少。这提示该途径激活是 CMS 诱导慢性炎症应答的重要途径。由于单核巨噬细胞膜上分布有糖皮质激素受体、去甲肾上腺素 (NE) 和肾上腺素 (E) 等激素受体<sup>[17]</sup>, 因而下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴) 可影响其分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等细胞因子, 而这些因子同时又是刺激 HPA 轴的有效分子。因此, 在机体遭受慢性应激时, HPA-单核巨噬细胞信息通路是神经-免疫-内分泌网络中的重要组成部分, 该通路在 CMS 所致的免疫性炎症疾病的发生与发展中起重要作用<sup>[14]</sup>。此外, 单核巨噬细胞作为机体重要的天然免疫细胞, 其表面存在 TLR4 样等模式识别受体, 在调节免疫和炎症应答方面有着重要作用<sup>[15-16]</sup>。

TLR4 与其内源性配体结合而被激活后, 通过激活 NF- $\kappa$ B 等途径调控多种促炎症因子的表达<sup>[17]</sup>。TLR4 在慢性应激所致免疫炎症性反应中的作用日益引起研究者的关注。研究表明, 应激状态下, ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠体内生成的 TLR4 的配体显著增加<sup>[15]</sup>。这些配体包括 CMS 应激状况下的脂蛋白氧

化修饰加剧所生成大量的氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 和轻度氧化低密度脂蛋白 (mm-LDL) 等 TLR4 内源性配体, 以及急性反应期生成的热休克蛋白<sup>[18]</sup> 等。这些配体与单核巨噬细胞上的 TLR4 结合后, 通过激活 TLR4 致使 TNF- $\alpha$  等促炎细胞因子增加。Zhang 等<sup>[19]</sup> 的研究结果发现, 经受束缚应激的 TLR4 基因正常 Balb/c 小鼠血浆中的 IL-1 $\beta$  与 TNF- $\alpha$  等炎症因子比 TLR4 基因缺陷 C.3H-TL4ps-d 小鼠显著增加, 这表明 TLR4 的激活在各种应激所致的炎症应答中有着重要作用。

综上所述, 在 CMS 状态下, 诱导 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠体内的 TLR4/NF- $\kappa$ B 途径激活而增加 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达可能通过以下两条途径: 一条是糖皮质激素等主要应激激素通过激活单核巨噬细胞等免疫细胞的 TLR4/NF- $\kappa$ B 途径; 另一条为应激时生成大量的内外源性 TLR4 配体。因此, 单核巨噬细胞等免疫细胞可能通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 途径将应激与致 As 的慢性免疫性炎症反应联系起来。

#### [参考文献]

- [1] Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy [J]. *Circulation*, 1999, 99 (16): 2192-2197.
- [2] Shively CA, Musseman DL, Willard SL. Stress, depression, and coronary artery disease: modeling comorbidity in female primates [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009, 33 (2): 133-144.
- [3] Brydon L, Edwards S, Jia HY, et al. Psychological stress activates interleukin-1 $\beta$  gene expression in human mononuclear cells [J]. *Brain Behav Immun*, 2005, 19 (6): 540-546.
- [4] 孙慧, 顾洪丰, 冬毕华, 等. 慢性应激动脉粥样硬化载脂蛋白 E 基因敲除小鼠内脏若干免疫炎症因子的表达变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 12 (7): 605.
- [5] Gu HF, Tang CK, Yang YZ, et al. Effects of chronic mild stress on the development of atherosclerosis and expression of toll-like receptor 4 signaling pathway in adolescent apolipoprotein E knockout mice [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 9: 13.
- [6] 顾洪丰, 陈忠平, 杨永宗. 普罗布考对 2 型糖尿病合并冠心病患者外周血单核细胞 Toll 样受体 4/核转录因子  $\kappa$ B 信号通路的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (12): 1009-1012.
- [7] 赵丽纯, 苏芸, 李康生. 天敌应激下血浆皮质酮、巨噬细胞产生 NO、IL-1 水平与脑不对称性 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31 (9): 824-827.
- [8] Yalcin I, Aksu F, Belzung C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 14 (2-3): 165-174.
- [9] Lena B, Cicely W, Andrew W, et al. Synergistic effects of psychological and immune stressors on inflammatory cytokine and sickness responses in humans [J]. *Brain Behav Immun*, 2009, 23 (2): 217-224.
- [10] Grippo AJ, Francis J, Fekler TG, et al. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia [J]. *Physiol Behav*, 2005, 84 (5): 697-706.
- [11] Kunz-Ebrecht SR, Mohamed-Ali V, Feldman PJ, et al. Cortisol responses to mild psychological stress are inversely associated with proinflammatory cytokines [J]. *Brain Behav Immun*, 2003, 17 (5): 373-383.
- [12] Garcia-Bueno CA, Leza JC. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2008, 32 (6): 1136-1151.
- [13] Ljundila Stojanovich. Stress and autoimmunity [J]. *Autoimmun Rev*, 2010, 9 (5): A271-A276.
- [14] Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (4): 1920-1925.
- [15] Koedel U, Mecht U M, Schmidt C, et al. Acute brain injury triggers MyD88-dependent TLR2/4-independent inflammatory responses [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171 (1): 200-213.
- [16] Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, et al. Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke [J]. *Stroke*, 2008, 39 (4): 1314-1320.
- [17] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124 (4): 783-801.
- [18] Cvoro A, Matic G. Hyperthermic stress stimulates the association of both constitutive and inducible isoforms of 70 kDa heat shock protein with rat liver glucocorticoid receptor [J]. *Internat J Biochem Cell Biol*, 2002, 34 (3): 279-285.
- [19] Zhang Y, Zhang Y, Miao J, et al. Chronic restraint stress promotes immune suppression through toll-like receptor 4-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling [J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 204 (1): 13-19.

(此文编辑 许雪梅)